

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/ CU 00/ 00004	International filing date (day/month/year) 16/11/2000	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 16/11/1999
Applicant CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR et al.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 6 sheets.
☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing :

☒ contained in the international application in written form.

☒ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (See Box I).

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box II).

4. With regard to the title,

☐ the text is approved as submitted by the applicant.

☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

ANTICUERPO MONOCLONAL RECOMBINANTE QUE RECONOCE EL ANTIGENO IORC2 SU USO PARA EL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE TUMORES COLORECTALES

5. With regard to the abstract,

☐ the text is approved as submitted by the applicant.

☒ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures.

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CU 00/00004

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

This Page Blank (uspto,

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claim 15 is directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 15

see annex

This Page Blank (uspto,

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ CU 00/00004

Recuadro III TEXTO DEL RESUMEN (Continuación del punto 5 de la primera hoja)

La presente invención se refiere a anticuerpos recombinantes derivados del anticuerpo monoclonal IOR C5 que reconoce el antígeno IOR C2 de células colorectales. Estos anticuerpos recombinantes tienen una inmunogenicidad reducida debido a mutaciones puntuales en las FRs.

Dichos anticuerpos son útiles para el diagnóstico y la terapia de tumores colorectales, sus metástasis y recidivas.

This Page Blank (uspto)

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°
PCT/CU 00/00004

A. CLASIFICACION DE LA INVENCION

CIP 7 C07K16/30 A61K39/395 A61K51/10 G01N33/574 G01N33/577

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP 7 C07K A61K G01N

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	WO 97 33916 A (CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR) 18 Septiembre 1997 (1997-09-18) página 5, línea 14 - línea 28 página 8, línea 4 -página 13, línea 28	1,9-15
Y	---	2-8
Y	US 5 712 120 A (RODRIGUEZ ROLANDO PEREZ ET AL) 27 Enero 1998 (1998-01-27) página 3, línea 30 - línea 64 página 4, línea 55 -página 6, línea 45	2-8
Y	--- VAZQUEZ A ET AL: "Characterization of ior C5 colorectal tumor associated antigen" INMUNOLOGIA, vol. 14, num. 3, 1995, páginas 130-132, XP002901659 el documento completo ---	1-15
	--- -/--	

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales

☒ Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

- "A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente
- "E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- "L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención
- "X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente
- "Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

20 Abril 2001

Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional

15. 05. 2001

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

A. C. Martin-Posadillo

This Page Blank (uspto)

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

nd Internacional N°
PCT/CU 00/00004

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES		
Categoría°	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
Y	<p>RIECHMANN L ET AL: "Reshaping human antibodies for therapy" NATURE, vol. 332, 24 Marzo 1988 (1988-03-24), páginas 323-327, XP002901660 el documento completo ---</p>	1-15
Y	<p>JONES P T ET AL: "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse" NATURE, vol. 321, 29 Mayo 1986 (1986-05-29), páginas 522-525, XP002901661 el documento completo -----</p>	1-15

This Page Blank (uspto)

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre miembros de la familia de patentes

Solicitud Internacional N°

PCT/CU 00/00004

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9733916 A	18-09-1997	NINGUNO	
US 5712120 A	27-01-1998	CA 2153135 A	31-12-1995
		CN 1133886 A	23-10-1996
		EP 0699755 A	06-03-1996
		JP 8280387 A	29-10-1996

This Page Blank (uspto)

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
25 de Mayo de 2001 (25.05.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 01/36485 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C07K 16/00

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/CU00/00004

(22) Fecha de presentación internacional:
16 de Noviembre de 2000 (16.11.2000)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
196/99 16 de Noviembre de 1999 (16.11.1999) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR
[CU/CU]; Calle 216 esq. 15, Atabey, Playa, Ciudad de la
Habana 12100 (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): MATEO
DE ACOSTA DEL RIO, Cristina María [CU/CU]; Calle
C No. 9510 entre 6 Y 10, Altahabana, Boyeros, Ciudad Ha-
bana 10800 (CU). ROQUE NAVARRO, Lourdes Tatiana
[CU/CU]; Calle 13 N° 4211 entre 42 y 44, Playa, Ciudad
de la Habana 11300 (CU). MORALES MORALES, Alejo
[CU/CU]; Santa Felicia No. 426 entre Melones y R. En-
rique, 10 de Octubre, Ciudad Habana 13200 (CU). PEREZ

RODRIGUEZ, Rolando [CU/CU]; Juan Delgado No 567
entre Acosta y O'Farrill, 10 de Octubre, Ciudad de la Ha-
bana 10500 (CU). AYALA AVILA, Marta [CU/CU]; Calle
186 No. 3117 entre 31 y 33, Playa, Ciudad Habana 12100
(CU). GAVILONDO COWLEY, Jorge Victor [CU/CU];
Calle G 460 Apto. 11, Plaza, Ciudad Habana 10400 (CU).
DUEÑAS PORTO, Marta [CU/CU]; Calle 186 No. 3117
entre 31 y 33, Playa, Ciudad Habana 10400 (CU). BELL
GARCIA, Hanssel [CU/CU]; Calle 62 N° 906 Apto. 16
entre 9 y 11, Playa, Ciudad de la Habana 12100 (CU).
RENGIFO CALZADO, Enrique [CU/CU]; Calle 170 N°
BCE2 Apto. 16, Playa, Ciudad de la Habana 12100 (CU).
IZNAGA ESCOBAR, Normando [CU/CU]; Avenida 31
No. 32005 entre 320 y 322, La Lisa, Ciudad de la Ha-
bana 17100 (CU). RAMOS ZUZARTE, Mayra [CU/CU];
Calle 184 N° BEE1 Apto. 12 entre 1° y 5° Playa, Ciudad
de la Habana 12100 (CU).

(74) Mandatario: MORENO SAMPER, Olga Lidia; Lex,
S.A., Avenida 1ra No. 1001 Esquina 10, Miramar, Playa,
Ciudad de la Habana 11300 (CU).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AU, BA,
BB, BG, BR, BZ, CA, CN, CR, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KP, KR, LC, LK,
LR, LS, LT, LV, MA, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, RO, SD, SG, SI, SK, SL, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: ANTIBODIES AND FV FRAGMENT RECOGNIZING ANTIGEN IOR C2

(54) Título: ANTICUERPOS Y FRAGMENTO FV QUE RECONOCEN EL ANTÍGENO IOR C2

(57) Abstract: The invention relates to the obtention of novel recombinant antibodies of novel recombinant antibodies from murine antibody IOR C5 produced by the hybridoma deposited under number ECCC 97061101 in accordance with the Budapest Treaty. Said recombinant antibodies were obtained using recombinant DNA technology and are characterized in that they recognize antigen IOR C2. The recombinant antibodies are specifically chimeric antibody, humanized antibody and the single-chain Fv fragment. The chimeric antibody contains variable domains of murine immunoglobuline and the constant regions of human immunoglobuline. The humanized antibody contains the constant regions of human immunoglobuline and has been specifically modified in the murine framework regions (FRs) and within the latter, in those areas that may result in an antigenic site for cells T. The Fv fragment contains the variable domains of murine immunoglobuline. The invention also relates to the utilization of recombinant antibodies derived from murine antibody IOR C5 in the diagnosis and therapy of colorectal tumors, the metastasis thereof and recurrences.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con la obtención de nuevos anticuerpos recombinantes a partir del anticuerpo murino IOR C5 producido por el hibridoma depositado según el tratado de Budapest bajo el número ECCC 97061101. Dichos anticuerpos recombinantes se obtuvieron mediante el empleo de la tecnología del ADN recombinante, y están caracterizados por su reconocimiento al antígeno denominado IOR C2. Los anticuerpos recombinantes son específicamente, el anticuerpo quimérico, el anticuerpo humanizado y el fragmento tipo Fv de cadena sencilla. El anticuerpo quimérico contiene los dominios variables de la inmunoglobulina murina y las regiones constante de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado contiene las regiones constante de la inmunoglobulina humana y ha sido modificado específicamente en la región de los marcos (FRs) murinos y dentro de estos en aquellas zonas que pudieran resultar en un sitio antigénico par las células T. El fragmento Fv contiene los dominios variables de la inmunoglobulina murina. La presente invención además se relaciona con el uso de los anticuerpos recombinantes derivados del anticuerpo murino IOR C5 para el diagnóstico y terapia de tumores colorrectales, sus metástasis y recidivas.

WO 01/36485 A2



(84) **Estados designados (regional):** patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

Publicada:

— *Sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe.*

ANTICUERPOS Y FRAGMENTO Fv QUE RECONOCEN EL ANTÍGENO ior C2

Sector Técnico

La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología y en particular con nuevos anticuerpos recombinantes obtenidos mediante el empleo de la ingeniería genética, específicamente con un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un fragmento de tipo Fv de cadena sencilla obtenidos a partir del anticuerpo murino ior C5, el cual reconoce epitopos expresados en un antígeno denominado ior C2 y que se ha caracterizado como un complejo glicoproteico que se expresa en células colorrectales malignas y normales.

Técnica anterior

Han sido probadas diferentes formas de tratamiento del carcinoma colorrectal siendo la resección quirúrgica del tumor la única que ha resultado curativa. La cirugía permite alcanzar altos porcentos de sobrevida en los casos que son detectados tempranamente, pero desafortunadamente la mayoría de los casos es diagnosticada en etapas en las que el tumor ya ha hecho metástasis.

Actualmente la estrategia a seguir para aumentar la sobrevida general ante la enfermedad abarca el diagnóstico, la terapéutica y la epidemiología. Los investigadores están evaluando métodos que permitan diagnosticar precozmente la enfermedad, o sea, en estados en que aún no se haya producido la diseminación hacia las capas más externas del órgano, etapas en las que el tumor aún es quirúrgicamente curable. De la misma forma el conocimiento de los factores epidemiológicos y el desarrollo de nuevos métodos terapéuticos más eficaces contribuirán al incremento de la sobrevida.

El uso de anticuerpos monoclonales (AcMs) o fragmentos de estos, marcados con isótopos radioactivos para la detección del cáncer por métodos inmunogamagráficos ha centrado la atención en los proyectos de investigación de los últimos años. Los AcMs han mostrado potencial suficiente para servir como portadores de radioisótopos y dirigirlos hacia los antígenos tumor asociados.

Algunos anticuerpos radiomarcados han sido utilizados para detectar tumores que están asociados con el antígeno carcinoembrionario (CEA). Los

anticuerpos contra el CEA, marcados con I-131 o I-125 son utilizados para detectar tumores que producen CEA o están asociados con este marcador (Patentes US No. 3 663 684, US No. 3 867 363 y US No. 3 927 193). También se conoce que los AcMs pueden ser marcados con Tc-99m con el objetivo de conformar agentes para el diagnóstico *"in vivo"*.

Después de más de 15 años de desarrollada la tecnología de hibridomas para la obtención de AcMs murinos (Köehler G., Milstein, C (1975) Nature 256, 495-497), los cuales son usados para la investigación y el diagnóstico de enfermedades, los mismos no han demostrado ser eficaces en la terapéutica de enfermedades, y esto ha sido en gran medida debido a la corta vida media de estas moléculas en humanos, así como al pobre reconocimiento de las funciones efectoras murinas por el sistema inmune humano y además por la respuesta inmunológica que provoca el origen murino de los mismos al ser inyectados en pacientes.

El desarrollo de la tecnología de ingeniería de genes ha revolucionado el potencial de los AcMs, ya que manipulando los genes de las inmunoglobulinas es posible hacer modificaciones en los anticuerpos con el objetivo de disminuir o eliminar la antigenicidad de los mismos, así como mejorar sus funciones efectoras cuando son usados en el tratamiento o diagnóstico de determinadas patologías. Estas manipulaciones tienen como objetivo esencial disminuir al máximo las diferencias en cuanto a propiedades inmunológicas entre el anticuerpo murino y una inmunoglobulina humana, sin alterar la especificidad por el antígeno (Morrison S. L. et al., 1989. Adv. Immunol. 44, 65-92).

Recientemente se han desarrollado varios métodos para humanizar anticuerpos de ratón o de rata y así disminuir la respuesta xenogénica contra proteínas extrañas en el uso humano. Uno de los primeros intentos para reducir la antigenicidad ha sido generando anticuerpos "quiméricos", en los cuales los dominios variables de las proteínas murinas fueron insertados en dominios constantes de moléculas humanas, con lo cual no solo se logra la disminución de la inmunogenicidad sino también el mejoramiento de funciones efectoras, ya que las mismas son humanas y por tanto reconocidas por el sistema inmune (Morrison S. L. et al (1984) P.N.A.S., USA 81, 6851-6855). Estas moléculas quiméricas

mantienen las características del anticuerpo original en relación con la unión al antígeno y su región constante no es inmunogénica, aunque mantiene la inmunogenicidad contra la región variable murina.

Otros autores han logrado disminuir aún más la inmunogenicidad, insertando las Regiones determinantes de la Complementariedad (CDRs) de los anticuerpos alogénicos sobre los marcos (FRs) de inmunoglobulinas humanas (Jones P.T. et al (1986) Nature 321, 522-524, Verhoeyen M et al (1988) Science 239, 1534-1536). En algunas aplicaciones de este método (Rietchmann L. et al (1988) Nature 332, 323-327; Queen C. et al (1989) P.N.A.S. USA 86, 10029-10033) los seis CDRs del anticuerpo murino fueron transplantados a FRs humanos, sin embargo las afinidades de unión al antígeno de estos anticuerpos "humanizados" disminuyó, y solo en algunos casos se logró recuperar la afinidad original en estos anticuerpos "humanizados", cambiando nuevamente algunos residuos de los FRs humanos por murinos (Tempest P.R (1991) Bio/Tech. 9, 266-272).

Mateo et al. (Patente US No. 5 712 120) describe un procedimiento para la reducción de la inmunogenicidad de los anticuerpos murinos. Según se describe en el procedimiento, las modificaciones están restringidas a los dominios variables y específicamente a los FRs murinos de los anticuerpos quiméricos. Mas aún, las modificaciones se realizan solamente en aquellas regiones de los FRs que tienen una estructura de hélice anfipática y que por tanto son potenciales epitopos reconocidos por las células T. El método propone sustituir los residuos murinos dentro de las regiones anfipáticas por los aminoácidos que se encuentren en la misma posición en las inmunoglobulinas humanas, quedando excluidos de estos cambios aquellos residuos que están involucrados en la estructura tridimensional del sitio de reconocimiento del antígeno, es decir la zona de Vernier, las estructuras canónicas de los CDRs y los aminoácidos en la internase entre las cadenas pesada y ligera.

El anticuerpo modificado por el método descrito por Mateo et al. retiene la capacidad de reconocimiento y unión al antígeno del anticuerpo original y resulta menos inmunogénico, lo cual incrementa su utilidad terapéutica. Mediante este procedimiento se logra, con un pequeño número de mutaciones, anticuerpos

modificados que muestran una reducción de la inmunogenicidad comparados con el anticuerpo quimérico.

El anticuerpo monoclonal IOR C5 (solicitud de patente WO 97/33916), es un anticuerpo de origen murino de isotipo IgG1 generado a partir de la inmunización de ratones Balb/c con la línea celular de cultivo humana SW1116 (adenocarcinoma colorrectal), reconoce un antígeno expresado preferencialmente en la superficie y citoplasma de células colorrectales malignas y normales. No reconoce a los antígenos CEA, Lewis a, Lewis b, Lewis a sialilado, ni a los antígenos de membrana de las células mononucleares periféricas, ni de los glóbulos rojos (Vázquez A. M. et al, Hybridoma 11, pág. 245-256, 1992).

Estudios de western blotting utilizando extractos de membrana de la línea SW1116 mostraron que este AcM reconoce un complejo glicoproteico al que se denominó ior C2, compuesto por una banda mayor de 145 KDa y una menor de 190 KDa (Vázquez A. M. et al, Year Immunol., Basel, Karger, vol. 7, pág. 137-145, 1993).

Es conocido del estado de la técnica también que mediante el empleo de las técnicas de ingeniería genética se construyen fragmentos recombinantes a partir de anticuerpos monoclonales. Existen numerosos reportes que validan la utilización de los diferentes tipos de fragmentos de anticuerpos tanto en el diagnóstico "in vivo" como en la terapia de diversas enfermedades.

Ira Pastan entre otros (EP 0796334 A1) describe la construcción de fragmentos de tipo Fv de cadena sencilla usando las regiones variables de anticuerpos que reconocen específicamente el carbohidrato relacionado con el antígeno Lewis Y. Basándose en dichos fragmentos desarrolla un método para detectar células portadoras de dicho antígeno, también aporta evidencias del efecto inhibidor que estos fragmentos ejercen sobre células portadoras del antígeno.

Divulgación de la Invención

La presente invención se relaciona con anticuerpos recombinantes obtenidos por ingeniería genética, específicamente con un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un fragmento de tipo Fv de cadena sencilla obtenidos a partir del anticuerpo murino IOR C5 producido por el hibridoma de

igual nombre depositado en correspondencia con el Tratado de Budapest bajo el número de acceso ECCC 97061101 en la colección Europea de Cultivos Celulares, el 11 de Junio de 1997, el cual reconoce epitopos expresados en un antígeno denominado IOR C2 y que se ha caracterizado como un complejo glicoproteico que se expresa en células colorrectales malignas y normales.

Asimismo la invención tiene que ver con las composiciones farmacéuticas que contienen los referidos anticuerpos recombinantes, útiles en el marcaje con isótopos radioactivos para el diagnóstico y la terapia de neoplasias malignas.

Descripción detallada de la invención.

Síntesis de ADNc y amplificación por RCP de las regiones variables del anticuerpo murino IOR C5.

El ácido ribonucleico (ARN) citoplasmático fue obtenido de 10^6 células de hibridoma del AcM IOR C5 (Vázquez A.M. et al. Year Immunol, Basel, Karger, vol 7, pág. 137-145, 1993). El anticuerpo murino IOR C5 fue obtenido por inmunización de ratones Balb/c con la línea celular de cultivo humana SW1116 (Vázquez A.M. et al, Hybridoma 11, pág 245-256, 1992). El método usado para la extracción del ARN fue el descrito por Faloro et al (Methods in Enzimology 65, 718-749, 1989).

La síntesis de ácido desoxiribonucleico complementario (ADNc) consistió en unir 5ug de ARN obtenido con 25 pmoles del oligo diseñado para hibridizar con el principio de la región constante de las IgG1 murinas y para la cadena ligera que hibridice en región constante kappa murina, 2.5 mM de cada deoxinucleótido (dNTPs), 50 mM Tris-Hcl pH 7.5, 75 mM KCl, 10 mM DTT, 8 mM $MgCl_2$ y 15 unidades de inhibidor de ARNasa en un volumen total de 50 ul. Esta mezcla es calentada a $70^{\circ}C$, por 10 minutos y enfriada lentamente hasta $37^{\circ}C$. Entonces se le añaden 100 unidades de enzima transcriptasa reversa y se incuba a $42^{\circ}C$ por una hora.

Las regiones variables de cadena ligera (VK) y de cadena pesada (VH) fueron amplificadas por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP). Brevemente, 5 ul de ADNc de VH o de VK se mezclan con 25 pmoles de oligonucleótidos específicos, 2.5 mM de cada dNTP, 5 ul de solución tampón 10X para la enzima ADN polimerasa y 1 unidad de esta enzima. Las muestras fueron

sometidas a 25 ciclos de RCP con temperaturas de 94°C, 30 seg; 50°C, 30 seg; 72°C, 1 min., con una incubación final de 5 minutos a 72°C.

Clonaje y secuenciación del cADN amplificado.

Los productos de las RCPs de VH y VK fueron clonados en el vector TA (TA Cloning kit). Promega, USA). Los clones resultantes fueron secuenciados por el método dideoxi-secuencia usando T7 ADN Polimerasa y el juego de reactivos de la casa comercial Pharmacia (T7 sequencing kit, Pharmacia, Sweden).

Construcción de genes quiméricos.

Los genes de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras fueron obtenidos por restricciones enzimáticas de las construcciones intermedias en el vector TA y clonados en los respectivos vectores de expresión (Coloma M.J. et al., Journal of Immunological Methods, 152, 89-104, 1992).

Los genes VH fueron cortados del vector TA por digestión enzimática con EcoRV y NheI y clonados en el vector de expresión PAH 4604, que tiene incluida una región constante IgG1 humana y como marcador de selección el gen de resistencia al histidinol. La construcción resultante es el C5VH-PAH4604. Los genes VK fueron cortados del vector TA por digestión con las enzimas EcoRV y Sall, para ser clonados en el vector PAG4622. Este vector tiene un gen de resistencia al gpt y la región constante utilizada fue la kappa humana. La construcción genética resultante es el C5VK-PAG4622.

Expresión del anticuerpo quimérico.

Células NSO fueron electroporadas con 10ug de C5VH-PAH4604 y 10ug de C5VK-PAG4622 linealizados con enzima PvuI. Los ADNs fueron mezclados, precipitados con etanol y disueltos en 25 ul de agua. Aproximadamente 10⁷ células crecieron hasta semi-confluencia, colectadas por centrifugación y resuspendidas en 0.5 ml de D'MEN junto con el ADN en una cubeta de electroporación. Después de 5 minutos en hielo las células fueron sometidas a un pulso de 170 volts y 960 uFaradios y dejadas en hielo por 30 minutos. Las células se cultivan en 20 ml de D'MEN con 10% de suero fetal de ternera y se dejan 24 horas recuperándose del pulso eléctrico. A este tiempo, se siembran las células en placas de 96 pozos con medio selectivo que contiene 10mM de histidinol. Los

clones transfectados se hicieron visibles a los 10 días de añadido el medio selectivo.

La presencia del anticuerpo humano en las placas fue detectada por ELISA. Las placas fueron recubiertas con un anticuerpo obtenido en chiva que reconoce específicamente cadena gamma humana, los pozos fueron lavados con PBS-T (solución salina tamponada que contiene 0.02% de Tween pH 7.5), 100 ul de sobrenadante de medio de cultivo fueron añadidos a cada pozo de las placas de ELISA y dejados una hora a 37°C. Los pozos fueron lavados con PBS-T y se le añadió un anticuerpo de chiva que reconoce cadena kappa humana y que está conjugado con fosfatasa alcalina se dejó a temperatura ambiente por una hora. Los pozos fueron lavados con PBS-T y se les añadió la solución tampón que contiene el sustrato dietanolamina. Después de media hora la absorbancia fue medida a 405 nm

Construcción del AcM humanizado IOR C5 por humanización de epitopos T.

Predicción de epitopos T.

Las secuencias de los dominios variables del ior C5 son analizadas con el Programa AMPHI (Berzofsky et al (1987) The Journal of Immunology 138, 2213-2229), el cual permite la identificación de segmentos de 7 ó de 11 aminoácidos con una estructura de hélice anfipática, a la cual se ha relacionado la inmunogenicidad T. Además se usó el programa SOHHA que predice también zonas de hélices hidrofóbicas. (Elliot et al., J. Immunol. 138: 2949-2952, (1987). Estos algoritmos predicen fragmentos relacionados con la presentación de epitopos T en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal murino ior C5.

Análisis de Homología con inmunoglobulinas humanas.

Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables del IOR C5 son comparadas con las secuencias de regiones variables de inmunoglobulinas humanas reportadas, para identificar la inmunoglobulina humana que posea mayor homología con la molécula murina sometida a análisis.

Las bases de secuencias humanas utilizadas fueron las reportadas en GeneBank y EMBL , ambas bases de datos se encuentran disponibles en

Internet. El programa que se utiliza para determinar la homología entre secuencias es el PC-DOS HIBIO PROSIS 06-00, Hitachi.

Análisis para la reducción de inmunogenicidad.

La esencia del método radica en lograr una reducción de la inmunogenicidad por la humanización de los posibles epitopos T, esto con un mínimo de mutaciones en los FRs, específicamente en aquellos segmentos que tienen una estructura de hélice anfipática, quedando excluidas aquellas posiciones involucradas con la estructura tridimensional del sitio de reconocimiento del antígeno.

Según el método, se comparan las secuencias de las regiones variables de VH y VL de la inmunoglobulina murina con la humana más homóloga y se identifican los residuos que difieren entre la secuencia murina y la secuencia humana, sólo en los segmentos anfipáticos que quedan dentro de la región de los marcos o "frameworks" (FRs) (Kabat E.(1991) Sequences of proteins of immunological interest, Fifth Edition, National Institute of Health), estos residuos "murinos" serán los susceptibles de ser mutados por aquellos que se encuentran en la misma posición en la secuencia humana.

Los residuos que se encuentran en las posiciones de los FRs responsables de las estructuras canónicas o en la zona de vernier, no pueden ser mutados, pues pueden afectar la estructura tridimensional del dominio variable del anticuerpo y por tanto afectar su unión al antígeno. Información adicional sobre la influencia de las sustituciones que se hacen en la estructura terciaria, pueden ser obtenidas por modelaje molecular de las regiones variables.

Clonaje y expresión del anticuerpo humanizado IOR C5 en células NSO.

Una vez obtenidas las construcciones genéticas correspondientes al IOR C5h por humanización de epitopos T, estas fueron clonadas en los vectores de expresión, de manera similar a la descrita anteriormente en el caso de la construcción del anticuerpo quimérico, obteniéndose las construcciones genéticas siguientes: C5VkhU-PAG4622 y C5Vhhu-PAH4604. La transfección de estos genes a las células NSO fue exactamente con las mismas condiciones que las descritas anteriormente en el caso del anticuerpo quimérico.

Obtención del Fragmento de tipo Fv de cadena sencilla.**Construcción y expresión del scFv.**

La estrategia contempla una primera amplificación por RCP que modifica las regiones VH y VL secuenciadas, incluyendo los sitios para endonucleasas de restricción para el clonaje en los vectores de expresión. En la amplificación se emplean oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia exacta.

Después de amplificadas, las regiones variables son purificadas y digeridas con las correspondientes enzimas de restricción. Los fragmentos de ADN se purifican y se ligan secuencialmente con los vectores de expresión. Posteriormente dichas construcciones genéticas son expresadas en E. coli, según los métodos convencionales.

En el proceso de extracción de la proteína desde las células productoras, se realiza mediante un proceso de ruptura por ultrasonido que permite separar fracción soluble e insoluble, combinado con electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida, transferencia a nitrocelulosa y Western blot.

La proteína se logra semipurificar por proceso que incluye: (1) separación del material soluble e insoluble por ultrasonido y centrifugación, (2) lavados a bajas molaridades de Urea y solubilización a altas molaridades de Urea. A partir del material solubilizado se purifica la proteína por cromatografía de afinidad a metales iónicos. Posteriormente se renaturaliza contra la solución tampón

Ejemplos de Realización**Ejemplo 1. Obtención del Anticuerpo Monoclonal Quimérico.**

Los ADN complementarios de VH y VK fueron obtenidos a partir del ARN del hibridoma productor del anticuerpo ior C5 y usando la enzima transcriptasa reversa.

Los oligonucleótidos específicos usados como cebadores fueron:

Para VH:

5'AGGTCTAGAA(CT)CTCCACACACAGG(AG)(AG)CCAGTGGATAGAC 3'

Para VK:

5'GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG 3'

El ADNc de las cadenas VH y VK fueron amplificadas por (RCP) con la enzima Taq polimerasa y utilizando oligonucleótidos específicos con sitios de restricción ECORV /NHEI, para VH y ECORV/SALI para VK, los oligonucleótidos específicos usados como cebadores en esta reacción de amplificación fueron:

5 Para VH:

Oligonucleótido 1:

5'GGGGATATCCACCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT 3'

Oligonucleótido 2:

5'TGGGTCGAC(AT)GATGGGG(GC)TGTTGTGCTAGCTGAGGAGAC 3'

10 Para VK:

Oligonucleótido 1:

5'GGGGATATCCACCATGAGG(GT)CCCC(AT)(GA)CTCAG(CT)T(CT)3'

Oligonucleótido 2:

5'AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC3'

15 El producto de la RCP fue clonado en el vector TA (TA cloning kit de la Invitrogen). Doce clones independientes fueron secuenciados por el método del dideoxido utilizando T7 ADN Pol (Farmacia). Las secuencias de VH y VK tienen alta relación con el subgrupo 2 de Kabat.

20 Posteriormente, la cadena VH fue digerida ECORV/NHEI y la VK ECORV/SALI, y clonadas en los vectores previamente digeridos con las mismas enzimas PAH4604 y PAG4622, para VH y VK respectivamente. Estos vectores fueron donados por Sherie Morrison (UCLA, California, USA). Los mismos son usados para la expresión de inmunoglobulinas en células superiores. El vector PAH 4604 tiene incluida la región constante humana IgG1 y el PAG 4622 humana Ck (Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction., M. Josefina Coloma et al, Journal of Immunological Methods, 152 (1992), 89-104) Una vez clonadas la regiones VH y 25 VK del IOR C5 en los vectores anteriores, se formaron las construcciones VHC5-PAH4604 y VKC5-PAG4622.

30 Las células NSO fueron electroporadas con 10 µg del vector quimérico C5VH-PAH4604 y 10 µg de C5VK-PAG4622, los mismos fueron linealizados por digestión con PVUI. Los ADN fueron mezclados, precipitados en etanol y

disueltos en 25 μ l de agua. Aproximadamente 10^7 células NSO fueron crecidas hasta semiconfluencia, obtenidas por centrifugación y resuspendidas en 0.5-1.0 ml DMEN conjuntamente con el ADN digerido en una cubeta de electroporación. Después de 5 minutos en hielo, a las células se les aplicó un pulso de 170 volts y 960 μ F (Gene-Pulser, Bio-Rad) y se dejaron en hielo por 30 minutos. Las células fueron colocadas en 20 ml DMEN más 10 % suero fetal bovino y se dejaron en estas condiciones por 48 horas para que se recuperaran. Después las células fueron distribuidas en placas de 96 pozos y se les aplicó medio selectivo (DMEN, 10 % suero fetal bovino, 10 mM de histidinol). Los clones transfectados se detectaron visualmente 10 días después. La expresión de los anticuerpos quiméricos en los pozos que contienen los clones transfectados fue detectada por ELISA. Las placas de microtítulos de 96 pozos para ELISA fueron recubiertas con el conjugado anti IgG humana, cadena gamma específica (Sera Lab). Después de lavarse con PBST (phosphate buffered saline) que contiene 0.02 % tween 20, pH 7.5), 20 μ l de medio de cultivo de las placas que contienen los transfectomas se le adicionaron a cada pozo de la placa de microtítulos 1 hora a 37°C.

Después las placas se lavan con PBST y se adiciona el anticuerpo anti cadena Kappa humana conjugado con fosfatasa alcalina, cadena ligera específica (Sera-Lab) y se incuba a 37°C durante 1 hora. Los pozos se lavan con PBST y se adiciona la solución tampón que contiene como sustrato la dietanolamina. La absorbancia fue medida a 405 nm.

Ejemplo 2. Obtención de diferentes versiones del Anticuerpo Humanizado.

Las secuencia de VH y VK IOR C5 fueron comparadas con una base de datos de secuencias humanas, obteniéndose la secuencia humana de mayor homología con el anticuerpo IOR C5. Posteriormente en ambas secuencias (VH y VK) se determinaron las regiones anfipáticas o posibles epitopos T.

En el caso de la región VH se introdujeron mutaciones en las posiciones 10 y 17, donde se sustituyeron los aminoácidos ASP y SER por GLY y THR respectivamente. Estas mutaciones se realizaron por sobrelapamientos de RCPs usando los oligonucleótidos 1 y 2 y 3 y 4, en un primer RCP y después se

sobrelapó el resultado de los mismos en otro RCP, usando solo los oligonucleótidos 2 y 4 cuyas secuencias se muestran a continuación (Kamman, M., Laufs, J., Schell, J., Gronemborg, B. Rapid insertional mutagenesis of ADN by polymerase chain reaction (RCP). Nucleic Acids Research 17:5404. (1989))

Oligonucleótidos para las mutaciones 10 y 17 de la cadena pesada.

Oligo 1:

5' GAGTCAGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGACACTTTCACTCACC 3'

Oligo 2:

5' TGGGTGCGAC(AT)GATGGGG(GC)TGTTGTGCTAGCTGAAGAGAC 3'

Oligo 3:

5' GGTGAGTGAAAGTGTCTGAGAAGGTTTCACCAGGCCAGGTCCTGACTC 3'

Oligo 4:

5' GGGGATATCCACCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT 3'

Una vez secuenciadas y verificadas las anteriores mutaciones, a los ADNs que portaban las mismas, se les introdujo en las posiciones 43 y 44 LYS y GLY, sustituyendo a los aminoácidos ASN y LYS. A continuación se muestran los oligonucleótidos 1 y 2 y 3 y 4, descritos para estas mutaciones. El sobrelapamiento de los productos de los RCPs se hizo de la misma manera descrita anteriormente. Las mutaciones fueron verificadas por secuencia. Esta construcción genética se le denominó C5VHhu.

Oligonucleótidos para las mutaciones 43 y 44 de la cadena pesada.

Oligo 1:

5' CAGTTTCCAGGAAAAGGACTGGAATGGATG 3'

Oligo 2:

5' TGGGTGCGAC(AT)GATGGGG(GC)TGTTGTGCTAGCTGAAGAGAC 3'

Oligo 3:

5' CATCCATTCCAGTCCTTTTCCTGGAAACTG 3'

Oligo 4:

5' GGGGATATCCACCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT 3'

Para la cadena VK se realizaron mutaciones en las posiciones 15, 45 y 63 sustituyendo ILE, LYS y THR, por LEU, ARG y SER, respectivamente.

Las mutaciones fueron introducidas de la misma manera que en la cadena pesada, a continuación se describen las secuencias de los oligonucleótidos utilizados. Esta construcción genética se le nombró C5Vkhu.

Oligonucleótidos para la mutación I15 de la cadena ligera.

Oligo 1:

5' TTGTCGGTTACCCTTGGACAACCAGCC 3'

Oligo 2:

5' AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC 3'

Oligo 3:

5' GGCTGGTTGTCCAAGGGTAACCGACAA 3'

Oligo 4:

5' GGGGATATCCACCATGAGG(GT)CCCC(AT)(GA)CTCAG(CT)T(CT)CT(TG)GT

Oligonucleótidos para la mutación K45 de la cadena ligera.

Oligo 1:

5' GGCCAGTCTCCAAGGCGCCTAATCTAT 3'

Oligo 2:

5' AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC 3'

Oligo 3:

5' ATAGATTAGGCGCCTTGGAGACTGGCC 3'

Oligo 4:

5' GGGGATATCCACCATGAGG(GT)CCCC(AT)(GA)CTCAG(CT)T(CT)CT(TG)GT

Oligonucleótidos para la mutación T63 de la cadena ligera.

Oligo 1:

5' CCTGACAGATTCAGTGGCAGTGGATCA 3'

Oligo 2:

5' AGCGTCGACTTACGTTT(TG)ATTTCCA(GA)CTT(GT)GTCCC 3'

Oligo 3:

5' TGATCCACTGCCACTGAATCTGTCAGG 3'

Oligo 4:

5' GGGGATATCCACCATGAGG(GT)CCCC(AT)(GA)CTCAG(CT)T(CT)CT(TG)GT

Una vez realizadas las mutaciones, estas fueron verificadas por secuencia.

Las cadenas VK y VH humanizadas fueron clonadas en los vectores PAG 4622 y PAH4604, formando las construcciones C5VHhu-PAH4604 y C5VKhu-PAG4622 respectivamente.

Las células NSO fueron electroporadas con 10 µg del vector humanizado C5VHhu-PAH4604 y 10 µg de C5VKhu-PAG4622, los mismos fueron linealizados por digestión con PVUI.

El proceso de electroporación y detección de los clones que expresaban el anticuerpo humanizado ior C5h fue idéntico al descrito para el anticuerpo quimérico.

Ejemplo 3. Obtención del Fragmento de tipo Fv de cadena sencilla.

Construcción de un fragmento tipo scFv (VH-linker-VL) a partir de los dominios variables (VH y VL), del AcM IOR C5 clonaje en vector adecuado para su expresión en E.coli.

Procedimiento (a). Construcción del scFv.-

La estrategia contempla una primera amplificación por RCP que modifica las regiones VH y VL secuenciadas, incluyendo los sitios para endonucleasas de restricción para el clonaje en los vectores de expresión pPACIB.7plus y pPACIB.9plus. En la amplificación se emplean los oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia exacta y que se muestran a continuación.

CADENA PESADA

4066: EcoRV-FR1-VH

5'.GGGATATCTGAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGA..3'

4255: EcoRV-FR4-VH

5'..CAGGATATCGCAGAGACAGTGACCAGAGTCCC..3'

CADENA LIGERA

2938: Sal I-FR1-VL

5'.CGTCGACGATATCCAGATGAC(AC)CA(GA)ACT(AC)C..3'

2935: Apa I- FR4-VL

5'.ATGGGCCCTTT(TC)A(TG)(TC)TCCAGCTTGGT..3'

Después de amplificadas, las regiones fueron purificadas, y digeridas VH (EcoRV) y VL (Sall-Apal). Los fragmentos de ADN fueron purificados y esta vez y ligados secuencialmente con los vectores denominados pPACIB.9plus y pPACIB.7plus, previamente digerido con las enzimas de restricción antes mencionadas. El pPACIB.7plus es un plásmido modificado para exportar hacia el periplasma, proteínas heterólogas cuyos genes son expresados en *E.coli*. El mismo consta de las secuencias regulatorias adecuadas para lograr tal función, entre ellas: secuencia promotora (triptofano), secuencia para péptido señal (ompA) con vistas a la secreción de la proteína clonada, la secuencia del péptido de unión reportada por Chaudahry et al. en 1990 y un dominio compuesto por 6 histidinas que se codifica en el N-terminal de la proteína madura, para facilitar la purificación posterior de la misma (Gavilondo, J.V. et al. Proceedings of the IV Annual Conference on Antibody Engineering. IBC Conferences Inc. Coronado, CA. December 8-10, 1993). El pPACIB.9plus (FIGURA 1) es un plásmido modificado para expresar proteínas de fusión en el citoplasma, cuyos genes son expresados en *E.coli*. El mismo consta de las secuencias regulatorias adecuadas para lograr tal función, entre ellas: secuencia promotora (triptofano), fragmento de 27aa derivados de la IL-2h con vistas a una eficiente expresión de la proteína a partir del gen clonado, y un dominio compuesto por 6 histidinas que se codifica en el C-terminal de la proteína madura, para facilitar la purificación posterior de la misma (Gavilondo, J.V. et al. Proceedings of the IV Annual Conference on Antibody Engineering. IBC Conferences Inc. Coronado, CA. December 8-10, 1993).

El producto de las reacciones de ligazón fue empleado para la transformación de células competentes de *E.coli* (cepa MC1061), que se plaquearon sobre medio sólido selectivo y crecieron a 37°C. Para la selección de los vectores recombinantes, un número de colonias bacterianas fueron inoculadas en medio líquido y sometidas a un proceso de extracción de ADN plasmídico (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición de 1989, por Sambrook, Fritsch y Maniatis). El ADN plasmídico fue digerido con las endonucleasas EcoRV, Sall/Apal, XhoI/Apal según la etapa del clonaje, y después de aplicados a un gel de agarosa y visualizados con luz ultravioleta, los

clones recombinantes se seleccionaron entre aquellos que presentaron dos bandas como patrón de digestión, una correspondiente al pPACIB.7 y 9plus (aprox. 2.9kb), y la segunda al dominio en cuestión (aprox. 320pb VH o VL y 720pb para el scFv). Para el dominio VH se chequeó orientación de la inserción mediante secuenciación del ADN.

Procedimiento (b). Expresión en *E.coli* del scFv obtenido a partir de los genes de los dominios variables del AcM ior C5

Se transformaron cuatro cepas de *E.coli* (TG1, coliB, W3110 y MM294) para estudios de expresión del gen clonado, empleando para ello dos de los plásmidos recombinantes seleccionados en (a). Básicamente, las bacterias recombinantes fueron crecidas en medio líquido (LB) con ampicillina, toda la noche a 37°C. A partir de estos cultivos se inocularon cultivos frescos conteniendo ampicillina, que fueron incubados por 3 hrs a 37°C. Pasado este tiempo se indujo la expresión de la proteína al añadir al cultivo ácido beta-indolacrílico (inductor del promotor triptofano). El análisis de las muestras de biomasa en geles de SDS-poliacrilamida al 12% indicó que bajo estas condiciones se expresa una proteína de aproximadamente 28 kDa en la fracción periplasmática para la construcción en el pPACIB.7plus y de unos 30 kDa para el clon recombinante en pPACIB.9plus, cuyo nivel de expresión en la cepa TG1 oscila entre el 6-11% de la proteína total bacteriana (Figura 1). Se demostró mediante un Western blot (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición de 1989, por Sambrook, Fritsch y Maniatis) con un antisuero obtenido en conejo contra el fragmento Fab del AcM IOR C5, e inmunopurificado, que esta proteína correspondía al scFv IOR C5

Ejemplo 4. Obtención del scFv a partir de cultivos bacterianos, renaturalización y ensayos de reconocimiento al antígeno.

Procedimiento (a). Extracción y renaturalización del scFv IOR C5 a partir del clon recombinante en pPACIB.9plus.

En el proceso de extracción de la proteína desde las células productores, mediante un proceso de ruptura por ultrasonido y que permite separar fracción soluble e insoluble, combinado con electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida,

transferencia a nitrocelulosa y Western blot, evidenció que la proteína se queda en la fracción insoluble bacteriana.

Dada estas circunstancias la proteína se logra semipurificar por proceso que incluye: (1) separación del material soluble e insoluble por ultrasonido y centrifugación, (2) lavados a bajas molaridades de urea (2 M) y (3) solubilización a altas molaridades de Urea (6 M). A partir del material solubilizado se purifica la proteína por cromatografía de afinidad a metales iónicos. Posteriormente se renaturaliza contra la solución tampón.

Procedimiento (b). Ensayo de unión a células tumorales del fragmento scFv-IORC5

Líneas celulares:

Las líneas empleadas se obtuvieron del Centro de Inmunología Molecular. La línea celular de adenocarcinoma de colón, SW948 fue cultivada en medio L-15 suplementado con 10% de suero fetal bovino a 37°C en 6 % CO₂. Las líneas celulares Raji (linfoma Burkitt humano) y Hut 78 (línea celular T humana) se emplearon como controles negativos. La línea Raji se cultivó en RPMI 1629 suplementado con 10 % de suero fetal bovino y la línea Hut 78 se cultivo en RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino y mantenidas a 37°C.

Las suspensiones celulares se ajustaron a una concentración de 10⁶ células/ml en tampón fosfato salino (PBS) conteniendo 1 % de albúmina de suero bovina. Se aplicaron 10 µl de la suspensión celular a cada pocillo. Las láminas se secaron en aire libre de polvo durante 3 horas y luego se fijaron con una solución de acetona-metanol (1:1) durante 5 minutos, seguido por una hidratación en TBS por 10 minutos. Finalmente las células fueron procesadas mediante un ensayo inmunocitoquímico.

La actividad del fragmento scFv IORC5 se determinó mediante un ensayo inmunocitoquímico, empleando la técnica de la inmunoperoxidasa. Las células se incubaron con el scFv IORC5 durante 2 horas a 37°C, seguido por una incubación con el suero anti Fab y con un conjugado anti-ratón peroxidasa de rábano picante (HRPO), cada uno durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los sitios de localización de la peroxidasa se visualizaron con una solución que contiene 5 mg de 3-3 diaminobencidina, 5 ml de TBS y 5 µl de H₂O₂ al 30 %. Entre

las incubaciones las láminas se lavaron con TBS frío. A continuación se sumergieron en agua, se contrastaron con Hematoxilina de Mayer y se montaron con Bálsamo de Canadá. En cada experimento se incluyeron controles celulares positivos y negativos.

5 Los estudios inmunocitoquímicos revelaron que este fragmento es negativo para las líneas celulares testadas, excepto para la línea SW948, que mostró un marcaje moderado en comparación con el AcM completo, demostrándose que existe un reconocimiento específico del scFv IORC5 por esta línea. El marcaje estuvo predominantemente asociado a la membrana y al compartimiento
10 citoplasmático en las células malignas del colon.

Breve descripción de las figuras

FIGURA 1: Representa gráficamente la construcción del plásmido pPACIB.9plus, es cual es un vector modificado para expresar proteínas de fusión en el citoplasma, cuyos genes son expresados en *E.coli*, el cual consta
15 de una secuencia promotora (triptofano), un fragmento de 27aa derivados de la IL-2h con vistas a una eficiente expresión de la proteína a partir del gen clonado, y un dominio compuesto por 6 histidinas que se codifica en el C-terminal de la proteína madura, para facilitar la purificación posterior de la
20 misma

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR
(Solicitante para todos los estados designados excepto para Estados Unidos de América)
MATEO DE ACOSTA DEL RIO, Maria Cristina
(Solicitante sólo para Estados Unidos de América)
ROQUE NAVARRO, Lourdes Tatiana
(Solicitante sólo para Estados Unidos de América)
MORALES MORALES, Alejo
(Solicitante sólo para Estados Unidos de América)
PEREZ RODRIGUEZ, Rolando
(Solicitante sólo para Estados Unidos de América)
AYALA AVILA, Marta
(Solicitante sólo para Estados Unidos de América)
GAVILONDO COWLEY, Jorge Víctor
(Solicitante sólo para Estados Unidos de América)
DUEÑAS PORTO, Marta
(Solicitante sólo para Estados Unidos de América)
BELL GARCIA, Hansse
(Solicitante sólo para Estados Unidos de América)
RENGIFO CALZADO, Enrique
(Solicitante sólo para Estados Unidos de América)
IZNAGA ESCOBAR, Normando
(Solicitante sólo para Estados Unidos de América)
RAMOS ZUZARTE, Mayra
(Solicitante sólo para Estados Unidos de América)

<120> ANTICUERPOS Y FRAGMENTO FV QUE RECONOCEN EL ANTIGENO
ior C2.

<130> CIM

<140> PCT/CU00/00004

<141> 2000-11-16

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2,0

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> mammalian

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(6)

<223> CDR1 DE LA CADENA PESADA DEL ANTICUERPO
RECOMBINANTE Y DEL FRAGMENTO FV

<400> 1

Ser Ala Tyr Asn Trp His

1

5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> mammalian

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(16)
<223> CDR2 DE LA CADENA PESADA DEL ANTICUERPO
RECOMBINANTE Y DEL FRAGMENTO FV

<400> 2
Tyr Ile Ser Tyr Asn Gly Thr Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> mammalian
<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(9)
<223> CDR3 DE LA CADENA PESADA DEL ANTICUERPO
RECOMBINANTE Y DEL FRAGMENTO FV

<400> 3
Asn Asp Glu Arg Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> mammalian
<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(16)
<223> CDR1 DE LA CADENA LIGERA DEL ANTICUERPO
RECOMBINANTE Y DEL FRAGMENTO FV

<400> 4
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> mammalian
<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(7)
<223> CDR2 DE LA CADENA LIGERA DEL ANTICUERPO
RECOMBINANTE Y DEL FRAGMENTO FV

<400> 5
Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> mammalian
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1)..(9)
 <223> CDR3 DE LA CADENA LIGERA DEL ANTICUERPO
 RECOMBINANTE Y DEL FRAGMENTO FV

<400> 6
 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> mammalian
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1)..(30)
 <223> FR1 DE LA CADENA PESADA DEL ANTICUERPO QUIMERICO
 Y DEL FRAGMENTO FV

<400> 7
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 20 25 30

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> mammalian
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1)..(14)
 <223> FR2 DE LA CADENA PESADA DEL ANTICUERPO QUIMERICO Y
 DEL FRAGMENTO FV

<400> 8
 Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 9
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> mammalian
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1)..(32)
 <223> FR3 DE LA CADENA PESADA DEL ANTICUERPO QUIMERICO Y
 DEL FRAGMENTO FV

22

<400> 9

Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> mammalian

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(11)

<223> FR4 DE LA CADENA PESADA DEL ANTICUERPO QUIMERICO Y
DEL FRAGMENTO FV

<400> 10

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 1 5 10

<210> 11

<211> 23

<212> PRT

<213> mammalian

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(23)

<223> FR1 DE LA CADENA LIGERA DEL ANTICUERPO QUIMERICO Y
DEL FRAGMENTO FV

<400> 11

Asp Trp Trp Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> mammalian

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(15)

<223> FR2 DE LA CADENA LIGERA DEL ANTICUERPO QUIMERICO Y
DEL FRAGMENTO FV

<400> 12

Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> mammalian
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1)..(32)
 <223> FR3 DE LA CADENA LIGERA DEL ANTICUERPO QUIMERICO Y
 DEL FRAGMENTO FV

<400> 13
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ala
 1 5 10 15
 Leu Lys Ile Arg Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> mammalian
 <220>
 <221> DOMAIN
 <222> (1)..(17)
 <223> FR4 DE LA CADENA LIGERA DEL ANTICUERPO QUIMERICO Y
 DEL FRAGMENTO FV

<400> 14
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Lys Ser Thr Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo recombinante y fragmento de tipo Fv de cadena sencilla derivados del anticuerpo monoclonal murino IOR C5 producido por el hibridoma con número de depósito ECCC 97061101, donde dicho anticuerpo recombinante contiene las Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDRs) del anticuerpo IOR C5 y regiones constantes humanas en las cadenas pesadas y ligeras.

2. Anticuerpo recombinante según la reivindicación 1 donde las secuencias de las Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDRs) de las cadenas pesada y ligera son las que se muestran a continuación:

CADENA PESADA

CDR1: S A Y N W H

CDR2: Y I S Y N G T T S Y N P S L K S

CDR3: N D E R A W F A Y

CADENA LIGERA

CDR1: K S S Q S L L D S D G K T Y L N

CDR2: L V S K L D S

CDR3: W Q G T H F P H T

3. Anticuerpo recombinante según las reivindicaciones 1 y 2 el cual es un anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo monoclonal murino IOR C5 que contiene las Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDRs) y las regiones de marco (FRs) de dicho anticuerpo murino, así como regiones constantes humanas en las cadenas pesadas y ligeras, donde las secuencias de las regiones de los marcos (FRs) de las cadenas pesada y ligera son las que se muestran a continuación:

CADENA PESADA

FR1: D V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V T G Y S I T

FR2: W I R Q F P G K G L E W M G

FR3: R I S I T R D T S K N Q F F L Q L N S V T T E D T A T Y Y C A R

FR4: W G Q G T L V T V S A

CADENA LIGERA

FR1: DVVMTQTPLTSLVTLGQPASISC

FR2: WLLQRPGQSPRRLIY

5 FR3: GVPDRFSGSGSGTDFALKIRRVEAEDLGYYC

FR4: FGGGTKLEIKRKSTLTG

4. Anticuerpo recombinante según las reivindicaciones 1 y 2 el cual es un anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo monoclonal murino IOR C5 que posee en las regiones de los marcos (FRs) de las cadenas pesada y
- 10 ligera mutaciones puntuales que reducen su inmunogenicidad.
5. Anticuerpo humanizado según la reivindicación 4 el cual posee en las regiones de los marcos (FRs) de las cadenas pesada y ligera cualesquiera de las mutaciones puntuales siguientes:

CADENA PESADA

15 Posición 10 ASP por GLY

Posición 17 SER por THR

Posición 43 ASN por LYS

Posición 44 LYS por GLY

CADENA LIGERA

20 Posición 15 ILE por LEU

Posición 45 LYS por ARG

Posición 63 THR por SER

6. Fragmento de anticuerpo de tipo Fv de cadena sencilla según la reivindicación 1 cuyas secuencias de las Regiones Determinantes de la
- 25 Complementariedad (CDRs) y de marco (FRs) en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera son las siguientes:

CADENA PESADA

FR1: DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSIT

FR2: WIRQFPGKGLEWMG

30 FR3: RISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCAR

FR4: WGQGTLVTVSA

CDR1: S A Y N W H

CDR2: Y I S Y N G T T S Y N P S L K S

CDR3: N D E R A W F A Y

5

CADENA LIGERA

FR1: D V V M T Q T P L T L S V T L G Q P A S I S C

FR2: W L L Q R P G Q S P R R L I Y

FR3: G V P D R F S G S G S G T D F A L K I R R V E A E D L G V Y Y C

10

FR4: F G G G T K L E I K R K S T L T G

CDR1: K S S Q S L L D S D G K T Y L N

CDR2: L V S K L D S

CDR3: W Q G T H F P H T

15

7. Línea celular que expresa el anticuerpo recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5.
8. Hospedero que expresa el fragmento Fv de las reivindicaciones 1 y 6.
9. Composición farmacéutica para el tratamiento de tumores malignos de colon y recto, sus metástasis y recidivas que contiene uno de los anticuerpos recombinantes de las reivindicaciones de la 1 a la 5, y un excipiente apropiado para su aplicación.
10. Composición farmacéutica para el tratamiento de tumores malignos de colon y recto, sus metástasis y recidivas que contiene el fragmento Fv de las reivindicaciones 1 y 6, y un excipiente apropiado para su aplicación.
11. Composición farmacéutica para la localización e identificación "*in vivo*" de tumores malignos de colon y recto, sus metástasis y recidivas caracterizada porque contiene uno de los anticuerpos de las reivindicaciones de la 1 a la 5.
12. Composición farmacéutica para la localización e identificación "*in vivo*" de tumores malignos de colon y recto, sus metástasis y recidivas caracterizada porque contiene que contiene el fragmento Fv de las reivindicaciones 1 y 6.

20

25

30

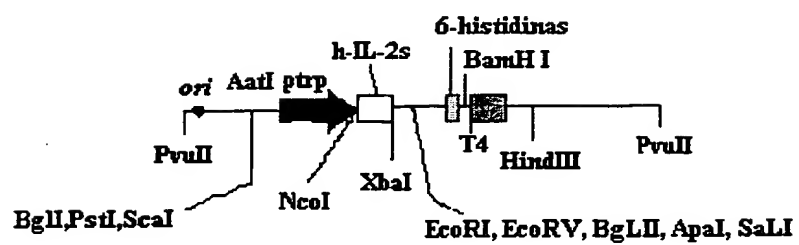
13. Composición farmacéutica según las reivindicaciones de la 9 a la 12 caracterizada porque contiene además compuestos para el radiomarcaje de dichos anticuerpos o fragmentos, los cuales se mezclan con los mismos para producir una solución acuosa administrable.

5 14. Composición farmacéutica según la reivindicación 13, caracterizada porque los radiomarcadores pueden ser el tecnecio 99, el renio 186, el renio 188 o sus análogos.

10 15. Método diagnóstico para la detección "*in vivo*" de tumores malignos de colon, sus metástasis y recidivas, caracterizado por la administración de una composición fisiológicamente aceptable que contiene cualquiera de los anticuerpos y fragmento de las reivindicaciones de la 1 a la 6 los cuales han sido previamente marcados con Tc-99m o sus y análogos, y el monitoreo de la biodistribución de dicha composición por métodos de inmunogammagrafía.

This Page Blank (uspto)

FIGURA 1

pPACIB.9+10(ca.3.0Kb)

This Page Blank (uspto)